

Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. G. A. Martini

LYMPHOCYTOTOXISCHE AUTOANTIKÖRPER BEI
AUTOIMMUNERKRANKUNGEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

HEINZ LUDWIG KLINGELHÖFER
aus Kleinseelheim/Krs. Marburg

Marburg 1975

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. G. A. Martini

LYMPHOCYTOTOXISCHE AUTOANTIKÖRPER BEI
AUTOIMMUNERKRANKUNGEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

HEINZ LUDWIG KLINGELHÖFER
aus Kleinseelheim/Krs. Marburg

Marburg 1975

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-
universität Marburg am 25.3.1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent: Priv.Do. Dr. med. H. Malchow

Correferent: Prof. Dr. med. K. Müller

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.1.0	Einleitung	1
1.2.0	Lymphozytotoxische Antikörper bei Krankheit	3
2.1.0	Methode und Materialien	4
2.2.0	Gewinnung der Lymphozyten mit Hilfe des Ficoll-Isopaque-Gradienten	5
2.3.0	Der Mikrozytotoxizitätstest	6
2.4.0	Durchführung	7
2.5.0	Der Vorversuch	8
2.5.1	Inkubationstemperatur und -dauer	8
2.5.2	Abhängigkeit von Komplement	11
3.1.0	Herkunft der Materialien	15
4.1.0	Daten und Ergebnisse	16
4.2.0	Interpretation der Befunde	24
4.3.0	Zuordnung der Antikörper zu einer Immunglobulinklasse	26
5.1.0	Diskussion	28
5.2.0	Verhältnis des beschriebenen Kälte- autoantikörpers zu den HL-A-Antikör- pern	28
5.3.0	Beziehung des lymphozytotoxischen Autoantikörpers zu serologischen Daten	30
5.4.0	Beziehung zu klinischen Daten und Therapie	32
5.5.0	Ergebnisse anderer Untersuchungen zu diesem Thema und Methodenkritik	34
5.6.0	Hypothesen	35
6.1.0	Zusammenfassung	37
7.1.0	Literaturverzeichnis	40



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552319_0064

1.1.0 Einleitung

Zirkulierende Antikörper gegen Lymphozyten wurden zuerst im Zusammenhang mit der Erforschung der Vorgänge beobachtet, die zur Abstoßung von Allotransplantaten durch den Empfänger führten. Medawar hatte 1946 eine Reihe von Versuchen über den Zusammenhang von Immunreaktion und Transplantatabstoßung vorgelegt (17). Dabei konnte er auch nachweisen, daß diese Reaktionen nicht nur durch die Übertragung von Geweben (Haut), sondern auch durch intradermale Injektion von Leukozyten induziert werden können. Diese Beobachtung gab den Grund zur Annahme, daß die Gewebsantigene, die eine Abstoßungsreaktion bei einem Empfänger transplantierten Gewebes hervorrufen, zumindest mit einigen Leukozytenantigenen übereinstimmen. Diese Antigene gewannen als Transplantationsantigene zunehmend Bedeutung. Im Gegensatz zu den zu transplantierenden Geweben - Niere, Leber, Herz usw. - sind Leukozyten ohne Schwierigkeiten einer Untersuchung in vitro zugänglich.

Schon 1938 hatte Gorer (8) gezeigt, daß in Antwort auf ein Hauttransplantat bei der Maus zirkulierende Antikörper gebildet werden, die in der Lage sind, Erythrozyten zu agglutinieren. Daß solche Antikörper auch Leukozyten agglutinieren, zeigte 1953 Amos (2). Damit war der Weg gewiesen, der mit Hilfe zirkulierender Antikörper, die nach einer Sensibilisierung mit Fremdgewebe auftauchen, zur Typisierung der Transplantationsantigene auf Leukozyten führte. Den ersten Schritt zur gezielten Systematisierung machte Dausset (6) 1958, indem er durch wiederholte kleine Bluttransfusionen derselben Spender bei sechs Probanden leukozytenagglutinierende Antikörper sehr ähnlicher Spezifität produzierte. Er nannte diese Spezifität "Mac".

Dennoch mußte davon ausgegangen werden, daß, entsprechend der Vielzahl der applizierten Antigene auch eine Vielzahl von Antikörpern differierender Spezifität mit dieser Methode erhalten wurden. Hinzu kam, daß die durch Transplantate oder Transfusionen erhaltenen Antikörper instabil waren. Die in verschiedenen Phasen nach dem Zeitpunkt der Sensibilisierung gewonnenen Antiseren erzielten sehr unterschiedliche Testergebnisse. Zum Dritten ist die verwendete Methode der Leukozytenagglutination relativ wenig empfindlich, so daß nur sehr avide Antikörper erfaßt werden.

Einen großen Fortschritt brachte die Entdeckung von Payne (26) und van Rood (28), daß sich im Blut vieler Frauen, die mehrfach geboren haben, Antikörper gegen die väterlichen Transplantationsantigene des Föten entwickeln. Diese Antikörper sind vielfach außerordentlich stabil, weisen jedoch eine Anzahl verschiedener Spezifitäten auf.

Ein weiterer entscheidender Fortschritt war die Methode von Terasaki (32), mit deren Hilfe in einem Mikroverfahren Seren auf cytotoxische Leukozytenantikörper untersucht werden können. Dieser Test ist im Gegensatz zum Agglutinationstest hoch empfindlich und gut reproduzierbar.

In der Entwicklung der Transplantationsimmunologie seit 1965 spielen somit Testseren von Mehrgebärenden und die Methode des Mikrocytotoxizitätstests - in mehreren Modifikationen - eine entscheidende Rolle. Mit Hilfe einfacher statistischer Verfahren, bei denen Antiseren in ihrem Verhalten gegen ein Panel⁺ von Testlymphozyten verglichen wurden, sowie durch die Auswertung der gewonnenen

⁺ Panel = ein Kollektiv statistisch ausgewählter Testobjekte.

Daten mit Computern gelang es, eine Reihe monospezifischer Antiseren, oder Antiseren mit Antikörpern sehr ähnlicher Spezifität, zu bestimmen, und mit ihrer Hilfe unterschiedliche Antigene oder Antigengruppen von Leukozyten zu klassifizieren.

Die größte Bedeutung als Transplantationsantigene gewonnen hierbei zunächst die Antigene der Leukozyten, die in dem serologisch definierten genetischen System der Human Leukocyte Antigens (HL-A-System) zusammengefaßt werden. Dafür bestimmend war die Erkenntnis, daß alle für die Transplantationsreaktion wesentlichen Gewebsantigene auf Leukozyten repräsentiert sind und durch einfache Verfahren bestimmt werden können. Den Anlaß für die Ordnung der Lymphozytenantigene in einem System brachten zahlreiche Familienstudien, die zeigten, daß das Vorhandensein bestimmter Transplantationsantigene oder -gruppierungen genetisch determiniert ist, ähnlich dem System der ABO-Blutgruppen, die ja auch als Transplantationsantigene aufzufassen sind. Die Arbeiten an dem HL-A-System sind noch nicht abgeschlossen.

1.2.0 Lymphozytotoxische Antikörper bei Krankheit

Schon bevor Antikörper, die durch Transplantation oder Transfusion hervorgerufen wurden, untersucht worden sind, bestand die Vermutung, daß die Leukopenie, die einige Krankheiten begleitet, auf Antikörper, die gegen Leukozyten gerichtet sind, zurückzuführen ist. Dieses Phänomen wurde für die Erkrankung mit Lupus Erythematoses Visceralis im Jahre 1951 von Michael et al. beschrieben (18). Die hier beobachtete Leukopenie war vor allem eine Lymphopenie. Angesichts der Tatsache, daß vor allem bei dieser Erkrankung eine Vielzahl ungewöhnlicher Antikörper auftreten (20), lag der Schluß nahe, auch für die beobachtete Leukopenie ein solches Phänomen verant-

wortlich zu machen. Gestützt wurde diese Hypothese noch durch die Ergebnisse von Antiglobulin-Consumptions-Tests (6,7), auch wenn diese für einen Beweis nicht ausreichten. Aufschluß brachten hier erst Techniken, die mit dem Fortschritt der Transplantationsimmunologie entwickelt worden waren, und hier vor allem der Mikrocyto-toxizitätstest.

Während die Frage nach cytotoxischen Leukozytenantikörpern bei verschiedenen Krankheiten noch unabhängig von den Erkenntnissen der Transplantationsimmunologie gestellt wurde, ist deren Beantwortung durch die Fortschritte in den serologischen Techniken der Transplantationsimmunologie erleichtert worden.

Erste Mitteilungen über das Vorkommen lymphozytotoxischer Antikörper bei Infektionskrankheiten, Lupus Erythematoses Visceralis und anderen Autoimmunerkrankungen, sowie bei Endocarditis Rheumatica, Myeloischer Leukämie, Lues u.a. und Morbus Hodgkin wurden 1970 und 1971 publiziert (10, 22,23,24,30,33).

In der vorliegenden Arbeit soll nach diesen ersten Mitteilungen geprüft werden, ob solche lymphozytotoxischen Antikörper bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen vorkommen und wie sie am besten nachgewiesen werden können.

2.1.0 Methode und Materialien

Für unsere Untersuchung standen uns verschiedene Varianten des von Terasaki (32) entwickelten Mikrocytotoxizitätstests zur Auswahl. Da aber in unserem Labor bereits routinemäßig Cytotoxizitätstests zur Bestimmung der Transplantationsantigene von Nierenspendern und -empfängern nach der Methode von Kissmeyer-Nielsen (11) durchgeführt wurden und damit bereits sämtliche Hilfs-

mittel hierfür vorhanden waren, wählten wir diese Methode aus praktischen Gründen auch für unsere Zwecke.

Die Methode hat folgende Schritte:

2.2.0 Gewinnung der Lymphozyten mit Hilfe des Ficoll-Isopaque-Gradienten (11)

1. 15 ml Venenblut werden unter Vorlage von 0,3 ml Heparinlösung (1 ml = 2000 I.E. Heparin) entnommen.
2. Das Blut wird in einem 50 ml Erlenmeyerkolben mit einer Spatelspitze Carbonyl-Eisenpulver vermischt und 10 min bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Die Granulozyten phagozytieren die Eisenpartikel und gehen damit bei den folgenden Schritten ins Sediment.
3. Das so vorbehandelte Blut wird zu gleichen Teilen in zwei 15 ml Glasröhrchen mit je 1,5 ml Dextranlösung vermischt und senkt 30 min lang bei 37°C im Wasserbad. Dabei gehen die Erythrozyten und die eisenbeladenen Granulozyten zum größten Teil ins Sediment, ebenso die Thrombozyten, die auf die Granulozyten aggregiert sind. Der lymphozytenreiche Überstand wird mit der Pasteurpipette abgenommen.
4. In Glasröhrchen von 9 mm Durchmesser werden 1 ml Ficoll-Isopaque-Lösung (9,556 g Ficoll-Pulver, 20 ml Ronpacon 75% und 130,4 ml aqua dest) mit 1,5 ml des Überstandes vorsichtig überschichtet und 14 min bei 1500 g und 4°C in der Kühlzentrifuge geschleudert. Dabei sammeln sich die restlichen Erythrozyten und Granulozyten des Überstandes am Boden des Gefäßes. Da die Dichte der Ficoll-Isopaque-Lösung mit 1,077 g/ml zwischen der der Erythrozyten (1,090 g/ml) und der der Lymphozyten (1,060 g/ml) liegt, werden beide Zellarten durch die Ficoll-Phase getrennt. Die Lymphozyten sammeln sich in einer dichten Schicht zwischen der Ficoll-

und der Plasmaphase und werden durch die Plasmaphase hindurch mit einer Pasteurpipette abgenommen. Da die Proteine der Ficoll-Lösung auf der Lymphozytenoberfläche haften und damit das spätere Testergebnis verfälschen können, muß eine Kontamination bei der Abnahme sorgfältig vermieden werden.

5. Die so gewonnenen Lymphozyten werden zweimal 10 min lang bei 350 g in je 5 ml Hank's Lösung (pH 7,45) gewaschen. Nach dem zweiten Waschen wird die überstehende Hank's Lösung abgeschüttet und die am Boden des Gefäßes befindlichen Lymphozyten kurz an der Luft getrocknet. •

6. Die Lymphozyten werden in gleichen Teilen AB-Serum und Kaninchenkomplement resuspendiert. Das AB-Serum stammt von einem gesunden Spender, bei dem vorher durch eine Untersuchung mit Testlymphozyten bekannter HL-A-Spezifität das Vorhandensein lymphocytotoxischer Antikörper ausgeschlossen wurde. Es wird in lyophilisiertem Zustand aufbewahrt. Bei dem Komplement handelt es sich um Vollserum von Kaninchen, welches ebenfalls in lyophilisiertem Zustand aufbewahrt wird.

Die Lymphozytensuspension ist frei von anderen Zellarten. Sie wird auf 6×10^6 Zellen pro ml eingestellt und kann damit für den nachfolgenden Test verwendet werden.

2.3.0 Der Mikrocytotoxizitätstest

Für den Test werden Plastikkammern verwendet, die als Boden ein Deckglas von 0,17 mm Dicke haben. Auf den Boden sind 18 ringförmige Felder mit leicht erhabenem Randwall aufgedruckt. Vor Gebrauch werden die Kammern mit 96%igem Alkohol gereinigt und mit 3 ml flüssigem Paraffin gefüllt. Das Paraffin soll die Testansätze vor dem Austrocknen bewahren.

Die Seren werden unter das Paraffin in die ringförmigen Felder in Mengen von je 0,001 ml (= 1 μ l) eingefüllt. Sollen die HL-A-Antigene von Lymphozyten bestimmt werden, erhält jedes Feld 0,001 ml eines spezifischen Antiserums. Für den Test vermischt man 0,001 ml der Lymphozytensuspension (= 6000 Zellen) mit den 0,001 ml Serum eines Feldes und inkubiert 30 min lang bei 37°C im Brutschrank. Danach werden zum Ablesen des Ergebnisses 0,0005 ml 1%-iger Trypanblaulösung hinzugefügt. Die Trypanblaulösung wird zuvor 5 min lang bei 500 g zentrifugiert, um unlösliche Partikel zu entfernen. Von Antikörpern zerstörte Zellen färben sich mit Trypanblau an, während unzerstörte Zellen farblos bleiben. Danach wird ein Deckglas von 53 x 28 mm über die Bodenplatte der Kammer gelegt und damit die Reaktionstropfen flächig ausgebreitet. Das Ablesen geschieht mit Hilfe eines Umkehr-Mikroskops. Die Bewertung erfolgt nach dem Prozentsatz der zerstörten Zellen pro Testansatz:

0 -	9 % = 0	= negativ
10 -	14 % = (+)	= zweifelhaft
15 -	24 % = +	= schwach positiv
25 -	49 % = ++	= positiv
50 -	74 % = +++	= stark positiv
75 -	100 % = ++++	= sehr stark positiv

2.4.0 Durchführung

Die Auswahl der Patienten, deren Seren auf autologe und homologe lymphocytotoxische Antikörper untersucht werden sollten, erfolgte nach deren Diagnose. Die Diagnose war jeweils klinisch und serologisch gesichert (bei 51 der 52 Patienten schon länger als ein Jahr). Nach dem zur Verfügung stehenden Krankengut wurde die Auswahl auf Erkrankungen mit:

1. Lupus Erythematodes Visceralis,
2. Progressiv Chronischer Polyarthritits,
3. Chronisch Agressiver Hepatitis und
4. Progressiver Sklerodermie

beschränkt. Von den Patienten wurden die klinischen und serologischen Daten, Krankheitsverlauf und Therapie registriert.

Für die Untersuchung wurden den Patienten 15 ml heparinisiertes Venenblut zur Lymphozytengewinnung sowie 10 ml Nativblut zur Serumgewinnung entnommen. Die Untersuchung der Proben erfolgte unmittelbar nach Entnahme mit der Bestimmung der Transplantationsantigene sowie der Testung von Serumproben auf autologe Cytotoxizität. Das restliche Serum wurde sofort eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

2.5.0 Der Vorversuch

Unter den Bedingungen des oben angeführten Testverfahrens zeigte das Serum der Patientin J.F. (Nr. 4 in Tabelle 1) als erstes eine cytotoxische Aktivität gegen die autologen Lymphozyten mit ca. 20% zerstörter Zellen. Mit Hilfe dieses Serums sollten in einem Vorversuch die Testbedingungen auf eventuell notwendige Modifikationen untersucht werden.

2.5.1 Inkubationstemperatur und -dauer

Für diesen Versuch wurde das Serum der Patientin J.F. mit den autologen Lymphozyten sowie den Lymphozyten von drei beliebig ausgewählten Spendern getestet. Inkubiert wurde bei 37°C in einem Brutschrank, bei Zimmertemperatur sowie in Eisbädern von 15°C und 10°C . Die Inkuba-

tionszeit wurde auf insgesamt vier Stunden verlängert, wobei nach 30 min, 1, 2, 3 und 4 Stunden die Reaktion abgelesen wurde.

Die Ergebnisse der Tests mit autologen und homologen Lymphozyten waren nahezu identisch, auch die Ergebnisse der drei Spenderlymphozyten zeigten untereinander kaum Abweichungen. Zur Sicherung der Ergebnisse war jeder Versuch vierfach angesetzt.

Die Daten der folgenden Abbildung 1 sind Mittelwerte der Ergebnisse aller vier Testlymphozyten.

Abbildung 1:

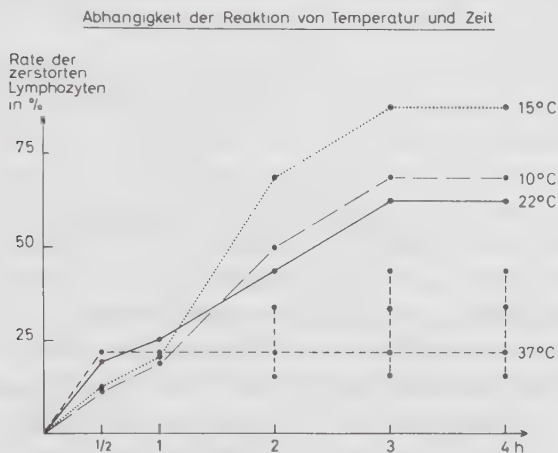


Abb. 1 zeigt das Reaktionsverhalten der lymphocytotoxischen Seren bei vier verschiedenen Temperaturbereichen (s.Text).

Jede der Reaktionen wurde durch einen Reaktionsansatz mit AB-Serum als Negativkontrolle kontrolliert. Voraussetzung für die Wertung eines Versuches war, daß die Negativkontrolle entweder

- a. nicht mehr als 10% zerstörter Zellen enthielt, oder
- b. bei Überschreitung dieses Prozentsatzes der Testansatz mindestens 20% stärker positiv war als die Negativkontrolle.

Die Einschränkung b. erwies sich als notwendig, weil vor allem bei der Inkubationstemperatur von 37°C mit zunehmender Inkubationsdauer unspezifisch positive Ergebnisse auftraten.

Aus diesem ersten Vorversuch ist folgendes Ergebnis zu entnehmen:

a. Der für die cytotoxische Aktivität des Serums der Patientin J.F. verantwortliche Antikörper zeigte ein anderes Temperaturverhalten als die gewohnten HL-A - Antikörper, die als Transplantationsreaktion nach einer Sensibilisierung mit körperfremdem Gewebe entstehen. Sein Temperaturoptimum lag deutlich um 15°C. Die Reaktion war unter den getesteten Bedingungen bei 37°C am schwächsten, aber noch deutlich wahrnehmbar.

Hinzu kommt, daß, während bei 15°C und bei Zimmertemperatur die Schwankungen in der Reaktionsstärke für die verschiedenen Lymphozyten minimal waren (geringer als 15%), bei 37°C mit zunehmender Inkubationsdauer größere Unterschiede auftraten (bis zu 40%).

b. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer erwies sich vor allem für die Tests bei 15°C als notwendig. Während bei 37°C die Reaktion bei mehr als einer Stunde Dauer kaum stärker wurde, erreichte sie bei 15°C ihr Optimum erst in der Zeit zwischen 2 und 3 Stunden.

Für die weitere Testung der Patientenserum waren also folgende Änderungen der Testbedingungen notwendig:

1. Die Testung mußte bei drei verschiedenen Temperaturstufen erfolgen, und
2. die Inkubationszeit mußte auf 3 Stunden verlängert werden.

Diese verlängerte Inkubationsdauer wurde trotz der oben angeführten Einschränkungen auch für 37°C beibehalten. Das für die Inkubation in der Kälte verwendete Eisbad wurde bald durch ein Kühlwasserbad ersetzt, bei dem eine Kammer aus 1,5 mm starkem Kupferblech von einer Flüssigkeit (aqua dest) durchströmt wurde, die ein Thermostat gleichmäßig auf 14,5°C hielt. Die Mikrotestplatten mit den Reaktionsansätzen wurden auf der Deckplatte der Kupferkammer inkubiert. Die Reaktionsansätze waren von der temperierten Kammer nur durch das 0,17 mm starke Bodenglas getrennt, so daß eventuelle Temperaturunterschiede zwischen beiden als gering zu veranschlagen sind.

2.5.2 Abhängigkeit von Komplement

Der erste Teil des Vorversuchs erfolgte mit Hilfe eines Patientenserums von starker Aktivität (bei 15°C nach dreistündiger Inkubation nahezu 100% zerstörter Zellen). Im weiteren Verlauf der Untersuchung fanden sich dann aber Seren, die in diesem Verfahren nur eine schwache Aktivität zeigten. Um aber

1. auch die Erfassung von Seren schwacher Aktivität zu sichern, und
2. die Trennung von positiver und negativer Reaktion deutlicher zu machen,

erschien es notwendig, die Empfindlichkeit des Testverfahrens zu steigern.

In Anlehnung an die von Mittal (21) beschriebene Methode wurde deshalb versucht, die Ein-Phasen-Methode nach

Kissmeyer-Nielsen zur Zwei-Phasen-Methode zu modifizieren. Die dafür notwendige Untersuchung erfolgte in drei Schritten. Als Probeserum diente das Serum der Patientin E.Sch., das in der Untersuchung nach der Ein-Phasen-Methode bei 15°C nach dreistündiger Inkubation eine Aktivität von ca. 40% zerstörter Zellen gezeigt hatte.

Erster Schritt: Verzögerter Zusatz von Komplement

Inkubationstemperatur: 37°C , 22°C und 15°C .

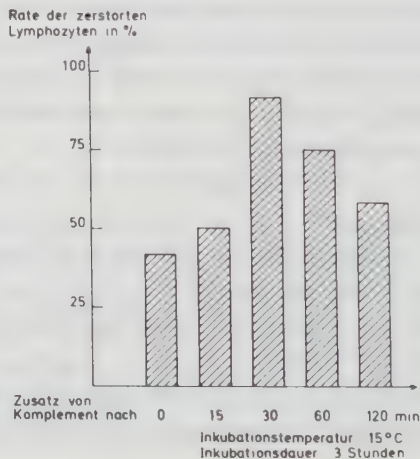
Gesamt-Inkubationsdauer: Drei Stunden und dreißig Minuten.

Ein Reaktionsansatz wurde über die gesamte Zeit ohne Komplement inkubiert. Die weiteren Ansätze wurden zunächst ohne Komplement bei den oben angegebenen Temperaturstufen inkubiert. Die Zugabe von Komplement in Mengen von je $1\mu\text{l}$ erfolgte dann nach 15, 30, 60 und 120 Minuten. Die Ergebnisse zeigt die folgende Abbildung.

Abbildung 2:

Abb.2 gibt eine graphische Darstellung über die Steigerung der Empfindlichkeit durch einen verzögerten Zusatz von Komplement.

Steigerung der Empfindlichkeit durch die Zwei-Phasen-Methode



Den Werten dieser Abbildung liegen die Ergebnisse der Inkubation bei 15°C zugrunde. Die Ergebnisse der Inkubation bei 22°C und 37°C waren analog.

Die Unterschiede in den Ergebnissen der hier getesteten Seren waren minimal und konnten vernachlässigt werden.

Das Ergebnis dieser Tests ist folgendermaßen zu interpretieren:

a. Die Inkubation ohne Komplement brachte kein Ergebnis. Das zeigt, daß die beobachtete cytolytische Wirkung der untersuchten Seren komplementabhängig ist.

b. Wenn man Komplement nicht schon von Anfang an dem Reaktionsansatz beigibt, sondern erst nach einer Vorinkubation ohne Komplement zusetzt, ist die Empfindlichkeit des Testverfahrens erheblich zu steigern. Dabei ist, wie man aus Abbildung 2 ersehen kann, das beste Ergebnis zu erzielen, wenn man das Komplement nach einer dreißigminütigen Vorinkubation ohne Komplement zusetzt. Auf diese Weise konnte die Empfindlichkeit des Verfahrens, gemessen an der Zahl der zerstörten Zellen pro Reaktionsansatz, verdoppelt werden.

Zweiter Schritt: Weitere Steigerung der Testempfindlichkeit durch Erhöhung des Komplementanteils

Um den Einfluß der zugesetzten Komplementmengen auf die Empfindlichkeit der Reaktion zu untersuchen, wurden Tests mit jeweils 1, 2 und 3 μ l Komplement angesetzt. Eine weitere Erhöhung der Mengen war aus technischen Gründen nicht möglich, da die vorgestanzten Felder der verwendeten Kammern (s.o.) eine begrenzte Kapazität aufwiesen. Die Ergebnisse dieser Tests zeigten allerdings auch, daß durch die Erhöhung des Komplementanteils eine wesentliche Steigerung der Empfindlichkeit nicht zu erzielen war. In den Tests mit einem Komplementanteil von 2 μ l lag die Rate der zerstörten Zellen nur um ca. 10 bis 15 % über

dem Ergebnis, das bei einem Zusatz von 1 μ l Komplement zu erzielen war. Eine Menge von 3 μ l brachte dann keine weitere erkennbare Steigerung der Empfindlichkeit.

Dritter Schritt: Die Temperaturbedingungen

In diesem Versuch wurde einmal die dreißigminütige Vorinkubation mit dem Antikörper in den Temperaturstufen 15°C, 22°C und 37°C, zum andern einheitlich bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die weitere Inkubation nach Zugabe von Komplement erfolgte dann jeweils in allen drei Temperaturstufen. Es zeigte sich, daß die erzielten Ergebnisse unabhängig davon waren, bei welcher Temperatur die Vorinkubation durchgeführt wurde. Bei den folgenden Versuchen wurde daher für alle untersuchten Temperaturbedingungen die Vorinkubation ohne Komplement bei Zimmertemperatur vorgenommen.

Die in den Vorversuchen ermittelten Ergebnisse berücksichtigten wir, um die entgültige Testanordnung festzulegen. Alle weiteren Versuche wurden mit der folgenden Anordnung angesetzt:

Zunächst 0,001 ml Serum, dann 0,001 ml Lymphozytensuspension = 6000 Zellen in AB-Serum.

Inkubation für 30 min bei 20-22°C.

Zugabe von 0,002 ml Kaninchenkomplement.

Inkubation der drei Parallelansätze für 3 Stunden bei 37°C, 22°C und 15°C.

Danach werden 0,0005 ml 1%iger Trypanblaulösung zugesetzt und dreißig Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert.

Nach dieser Zeit wird der Test sofort unter dem Umkehrmikroskop abgelesen. Die Reaktion ist als positiv zu werten, wenn bei vollständig negativer Kontrolle mehr als 15% der Zellen zerstört sind.

3.1.0 Herkunft der Materialien:

1. Ficoll - Pharmacia, Uppsala, Schweden.
2. Phasenkontrast-Umkehrmikroskop - Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland.
3. Mikrotest-Platten - Møller - coates, Høyden, Moss, Norwegen.
4. Mikroliter - Spritzen "Hamilton" - W. Fischer Apparatebau, Frankfurt/M., Westdeutschland.
5. Thermostat - Ultra Kryostat KT 20 K, Colora Meßtechnik, Lorch/Wttbg., Westdeutschland, nach eigenen Angaben umgebaut und mit einer durchströmten Kammer versehen, auf der die Mikrotestplatten temperaturkonstant inkubiert werden.
6. Heparin - Thrombo-Vetren, Promonta, Hamburg, Westdeutschland.
7. Carbonyl-Eisenpulver - BASF, Ludwigshafen, Westdeutschland.
8. Kaninchen-Komplement (lyophilisiert) - Behringwerke AG, Marburg/Lahn, Westdeutschland.
9. Paraffin (flüssig) - Merck, Darmstadt, Westdeutschland.
10. Isopaque = Ronpacon

4.1.0 Daten und Ergebnisse

Es wurden Seren von 52 Patienten sowie eines Kontrollkollektivs von 18 gesunden Spendern der Blutbank untersucht. Die Patienten unterteilen sich nach ihren Diagnosen in:

10 Patienten mit Lupus erythematoses visceralis (LE),
24 Patienten mit rheumatoider Arthritis (PCP),
16 Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis und
2 Patienten mit progressiver Sklerodermie.

Jede Serumprobe wurde nach der oben angeführten Methode^a gegen ein Kollektiv von 50 Spenderlymphozyten auf cytotoxische Aktivität überprüft, nachdem schon am Tag der Entnahme das Serum auf autologe Cytotoxizität getestet, sowie bei dem größten Teil der Patienten die HL-A-Antigene der Lymphozyten bestimmt worden waren. Der Vorrat an Testseren mit spezifischen HL-A-Antikörpern reichte zur Bestimmung der Lymphozytenantigene aller Patienten nicht aus. Die zur Untersuchung verwendeten Lymphozyten stammten sowohl von gesunden Spendern, als auch von den Patienten mit den oben angeführten Erkrankungen.

Die Testung gegen fünfzig verschiedene Lymphozyten erfolgte, um statistisch eine hinreichende Gewißheit zu erhalten, daß die cytotoxische Aktivität der untersuchten Seren gegenüber möglichst allen HL-A-Spezifitäten erprobt worden war. Das war notwendig, weil ein Kollektiv von Lymphozyten bekannter Spezifität hier nicht zur Verfügung stand.

Bevor die Ergebnisse dieser Tests referiert werden, soll die folgende Tabelle 1 eine Aufstellung aller Patienten mit Diagnose, Therapie, serologischen Daten und HL-A-Typisierung geben.

Tabelle 1:

Nr	DIA- GNOSE	NAME	SEX	ALTER	THERAPIE Ster Cyt	ANF	LE-F	LE-Z	RF	AUTO- LOG	HOMO- LOG
1	LE	L.E.	K	51 J	+	+	+	+	+	0	+
2	LE	S.A.	W	55 J	+	+	0	+	0	0	0
3	LE	P.I.	W	48 J	+	0	+	0	0	0	0
4	LE	F.J.	W	41 J	+	+	+	+	0	+	+
5	LE	K.K.	M	21 J	0	+	+	+	0	+	+
6	LE	S.D.	M	32 J	+	+	+	+	0	0	0
7	LE	S.A.	W	34 J	0	+	+	+	0	0	0
8	LE	W.G.	W	63 J	+	+	+	+	0	0	+
9	LE	S.K.	W	57 J	+	+	0	0	0	0	+
10	LE	O.E.	W	37 J	+	+	+	+	0	+	0
11	PCP	S.C.	K	66 J	0	0	0	0	0	0	0
12	PCP	H.A.	W	45 J	+	0	0	0	+	0	0

Nr	DIA- GNOSE	NANE	SEX	ALTER	THERAPIE Ster Cyt	ANF	LE-F	LE-Z	RF	AUTO- LOG	HOMO- LOG
13	PCP	F.A.	M	51 J	+	0	0	0	0	0	0
14	PCP	S.M.	W	24 J	+	0	0	0	+	0	+
15	PCP	W.H.	M	56 J	+	0	0	0	+	0	0
16	PCP	S.K.	W	56 J	+	0	0	0	+	0	0
17	PCP	A.A.	W	50 J	+	0	0	0	0	+	+
18	PCP	N.O.	W	48 J	+	0	0	0	+	0	0
19	PCP	S.E.	W	61 J	+	0	0	0	+	0	0
20	PCP	K.A.	W	33 J	+	0	0	0	0	0	0
21	PCP	S.E.	W	68 J	+	0	0	0	+	+	+
22	PCP	P.W.	M	39 J	+	0	0	0	0	+	+
23	PCP	K.A.	W	45 J	+	0	0	0	+	+	+
24	PCP	N.L.	W	57 J	+	0	0	0	0	0	0

Nr	DIA- GNOSE	NAME	SEX	ALTER	THERAPIE Ster Cyt	ANT	LE-F	LE-Z	RF	AUTO- LOG	HOMO- LOG
25	PCP	K.E.	W	32 J	o	o	o	o	o	o	o
26	PCP	V.A.	W	58 J	+	o	o	o	o	o	o
27	PCP	E.T.	W	57 J	+	o	o	o	+	+	+
28	PCP	L.E.	W	58 J	+	o	o	o	+	o	+
29	PCP	K.M.	W	73 J	+	o	o	o	o	o	o
30	PCP	S.M.L.	W	38 J	o	o	o	o	+	o	o
31	PCP	B.R.	W	36 J	o	o	o	o	o	o	o
32	PCP	F.A.	M	56 J	+	o	o	o	+	o	o
33	PCP	O.E.	W	38 J	+	o	o	o	o	o	o
34	PCP	R.M.	W	43 J	+	o	o	o	+	o	o
35	CAH	R.M.	M	69 J	o	o	o	o	o	o	o
36	CAH	S.G.	W	58 J	+	o	o	o	o	o	o

Nr	DIA- GNOSE	NAME	SEX	ALTER	THERAPIE Ster Cyt	ANF	LE-F	LE-Z	RF	AUTO- LOG	HOMO- LOG
37	CAH	K.U.	W	19 J	+	0	0	0	0	0	0
38	CAH	B.E.	W	49 J	+	0	0	0	0	0	0
39	CAH	F.D.	W	64 J	+	0	0	0	0	0	0
40	CAH	S.A.	W	73 J	+	0	0	0	0	0	0
41	CAH	S.K.	M	73 J	0	0	0	0	0	0	0
42	CAH	B.E.	W	18 J	0	0	0	0	0	0	0
43	CAH	E.D.	M	26 J	0	0	0	0	0	0	0
44	CAH	H.N.	W	61 J	+	0	0	0	0	0	0
45	CAH	M.P.	W	51 J	+	0	0	0	0	0	0
46	CAH	N.N.	M	50 J	0	0	0	0	0	0	0
47	CAH	R.H.	M	52 J	0	0	0	0	0	0	0
48	CAH	T.T.	M	25 J	0	0	0	0	0	0	0

Nr	DIA- GNOSE	NAME	SEX	ALTER	THERAPIE Ster Cyt	ANF	LE-F	LE-Z	RF	AUTO- LOG	HOMO- LOG
49	CAH	A.R.	W	42 J	+	o	o	o	o	o	o
50	CAH	E.O.	M	26 J	o	o	o	o	o	o	o
51	SKLERO	M.A.	W	61 J	+	o	o	o	o	+	+
52	DERMIE	B.V.	W	63 J	+	o	o	o	+	o	o

Legende zu Tabelle 1

Zusammenstellung aller untersuchten Patienten
nach Diagnose, Geschlecht, Alter, Therapie,
klinisch-serologischer Untersuchung und Test-
ergebnis mit autologen und homologen Zellen.
Abkürzungen siehe Text.

Die Auswertung der 10500 Einzeltests erbrachte folgende Ergebnisse:

Die Seren der 18 gesunden Spender sowie die Seren der 16 Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis zeigten keinerlei lymphocytotoxische Aktivität. Die Tests mit den Seren von Patienten mit LE, PCP und progressiver Sklerodermie hingegen brachten eine Reihe positiver Ergebnisse. Dabei ergab sich eine weitere Schwierigkeit in der Bewertung: Während einige der Seren, mit unterschiedlicher Stärke von Serum zu Serum, mit entweder allen oder zumindest mehr als fünfzig Prozent der Testlymphozyten reagierten, zeigten andere eine Reaktion mit nur einzelnen Lymphozyten. Die Kontrolle war dabei jeweils negativ. Hinzu kam, daß diese Seren im Test gegen die autologen Lymphozyten durchweg ein negatives Ergebnis hatten. Aus diesem Grund wurden vier dieser Seren ein weiteres Mal gegen die Lymphozyten getestet, mit denen sie im ersten Fall eine Reaktion gezeigt hatten. Bei allen vier Seren mußte dabei der ursprünglich positive Befund korrigiert werden. Es waren also unspezifisch positive Ergebnisse aufgetreten, deren Ursache nicht mehr zu ermitteln war. Dieser Befund machte es erforderlich, ein weiteres Kriterium dafür einzuführen, ob ein Serum bei den vorliegenden Bedingungen als cytotoxisch anzusehen ist. Es muß also:

1. Bei negativer Kontrolle mehr als 15% der Lymphozyten zerstört, und
2. mit mehr als 50% der getesteten Lymphozyten reagiert haben.

Unter diesen Kriterien zeigten von den untersuchten Patientenserum elf eine cytotoxische Aktivität. Die folgende Tabelle 2 gibt eine Aufstellung dieser Befunde aufgeschlüsselt nach Diagnose, Daten der Patienten, Art und Stärke der Reaktion.

Tabelle 2:

AUTOLOG

HOMOLOG

15°

37°

NAME	ALTER	SEX	DIAGNOSE	15°	22°	37°	15°	2	1	0	0	1	2	3	4	5
L.E.	51	M	LE	0	0	2	0	0	2	6	42	17	27	2	4	0
F.J.	41	W	LE	5	4	2	19	23	8			7	18	17	8	
K.K.	21	M	LE	4	0	0			3	9	23	15	28	16	5	1
O.E.	32	W	LE	3	2	1			7	4	3	6	12	6	2	
A.A.	49	W	PCP	3	0	0				7	13	30	32	12	6	
S.E.	68	W	PCP	4	3	2		14	8	13	5	10	29	14	6	1
P.W.	49	M	PCP	4	2	3				5	21	24	38	8	4	
K.A.	43	W	PCP	0	0	1				5	22	23	26	16	8	
H.T.	59	W	PCP	4	3	2	2	12	7	12	6	11	38	9	3	
M.A.	60	W	Sklerod.	4	3	0	5	12	3			8	7	3	2	
S.A.	55	W	LE	0	0	0				2	28	27	3			
P.J.	48	W	LE	0	0	0					30	29		1		
W.G.	63	W	LE	0	0	0			4	4	22	24	7	2		
S.K.	57	W	LE	0	0	0			3	8	4	15	24	3	2	1
F.A.	51	M	PCP	0	0	0				3	27	27	3			
S.M.	24	W	PCP	0	0	0			1	6	43	21	20	5	4	

Legende zu Tabelle 2

Tabelle 2 enthält alle positiven Testergebnisse. Sie gibt unter der Spalte AUTOLOG die Reaktionsstärke bei den Temperaturen 15° , 22° und 37° wieder. Im oberen Teil der Tabelle sind die positiven Befunde mit den autologen Zellen zusammengefaßt, im unteren Teil der Tabelle sind auch die Befunde wiedergegeben, wo gelegentlich positive Befunde mit homologen Zellen auftraten.

Auf der rechten Hälfte der Tabelle, unter der Spalte HOMOLOG ist angegeben, wie häufig positive Befunde bei den Reaktionsstärken 1-5 auftraten, aufgeteilt nach den Inkubationstemperaturen 15° und 37° . Im oberen Teil der Tabelle sind die Seren mit 50 Zellen getestet worden. Ausnahmen sind O.E. und M.A. Im unteren Teil, mit nur gelegentlich positiven Ergebnissen, wurden die Seren nur mit 30 Zellen getestet, bis auf S.M.

4.2.0 Interpretation der Befunde:

In Tabelle 2 sind alle positiven Befunde wiedergegeben. In ihr sind die Ergebnisse der 50 Tests mit homologen Lymphozyten nach der Stärke ihrer Reaktion bei 15°C und 37°C aufgeschlüsselt. Zur Interpretation siehe auch Legende zu Tabelle 2.

Zwei der Patientenseren (L.E. mit Lupus erythematoses und S.M. mit PCP) zeigen im Test gegen homologe Lymphozyten ausschließlich bei einer Inkubationstemperatur von 37°C eine schwache Reaktion. Die Reaktion erfolgte mit 70% bzw. 80% der getesteten Zellen. Darauf soll später eingegangen werden.

Im Gegensatz dazu zeigen die übrigen neun Seren mit zytotoxischer Aktivität ein - trotz unterschiedlicher Reak-

tionsstärken - einheitliches Verhalten, das durch zwei Kriterien ausgezeichnet ist:

1. Sie haben ihr Reaktionsoptimum bei einer Inkubationstemperatur von 15°C . Zwei von ihnen reagieren sogar ausschließlich bei dieser Temperatur.
2. Sie sind nicht nur für homologe, sondern auch für autologe Lymphozyten cytotoxisch.

Setzt man die Reaktionsstärke dieser Autoantikörper bei 15°C gleich 100%, so läßt sich ihr Temperaturverhalten wie folgt ausdrücken:

Abbildung 3

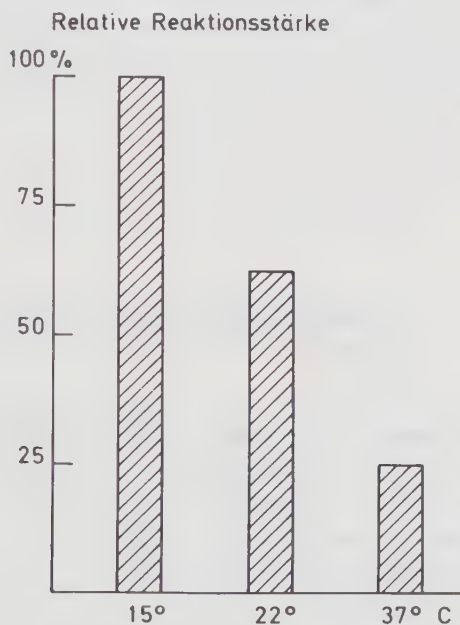


Abb.3. Relative Reaktionsstärke in drei Temperaturbereichen.

Es ist deutlich, daß das Verhalten der beiden oben erwähnten Seren, deren Aktivität sich ausschließlich bei 37°C gegen homologe Lymphozyten richtet, diesem Schema nicht entspricht. Ihr Verhalten erinnert vielmehr an wenig avide, polyspezifische Transplantationsantikörper, wie sie als HL-A-Antikörper schon bekannt sind. Bei beiden Patienten konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, was eine mögliche Sensibilisierung gegen homologe Gewebsantigene zur Folge gehabt haben könnte (Schwangerschaft, multiple Transfusionen, Transplantation etc.). Ein Kollektiv mit Lymphozyten bekannter HL-A-Spezifität, das eine nähere Klassifizierung dieser Seren erlaubt hätte, stand ebenfalls nicht zur Verfügung (s.o.). Da die beiden Seren sich aber von der oben beschriebenen neuartigen autolog-cytotoxischen Aktivität in der gleichen Weise wie HL-A-Antiseren unterscheiden (s.u.), sollen sie bei der weiteren Betrachtung nicht zu den autolog cytotoxischen Seren gezählt werden.

4.3.0 Zuordnung der Antikörper zu einer Immunglobulin- klasse

Die Zuordnung der Antikörper sollte zunächst für die Immunglobulinfraktionen IgG und IgM untersucht werden. Es sollte geprüft werden, ob mit der Entfernung einer dieser Fraktionen aus dem Serum auch die cytotoxische Aktivität dieses Serums beseitigt werden kann. Zu diesem Zweck wurden Serumproben mit spezifischen Anti-IgG- bzw. Anti-IgM-Seren vom Kaninchen vermischt, um mit einer Antigen-Antikörperreaktion die einzelnen Globulinfraktionen auszufällen. Diese Reaktion gehorcht einer Gesetzmäßigkeit, wie sie durch die Heidelberger-Kurve beschrieben ist, d.h. also, eine quantitative Reaktion zwischen Antigen und Antikörper findet nur im jeweiligen Äquivalenzbereich statt. Außerhalb dieses Bereichs liegen Antigen-Antikörper-Aggregate und freies Antigen und freier Antikörper in unterschiedlichem Verhältnis vor.

Da dieser Äquivalenzbereich hier nicht bekannt war, wurden Serum-Antiserum-Mischungsreihen im Verhältnis von 7:1 bis 1:15 hergestellt. Die Mischungen wurden intensiv geschüttelt, dreißig Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend für 12 Stunden bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt. Danach wurden sie 30 Minuten lang bei 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand über dem Präzipitat wurde abgenommen und seine Reaktion gegen Lymphozyten von vier unterschiedlichen Individuen im Mikrozytotoxizitätstest untersucht. Dabei brachten alle untersuchten Seren das gleiche Ergebnis. Die Abbildung 4 zeigt das Ergebnis bei 15°, die Ergebnisse bei 22° und 37° waren analog. Zur Kontrolle dienten inaktiviertes AB-Serum, inaktiviertes Kaninchenserum und TC 199 in den entsprechenden Verdünnungen.

Abbildung 4:

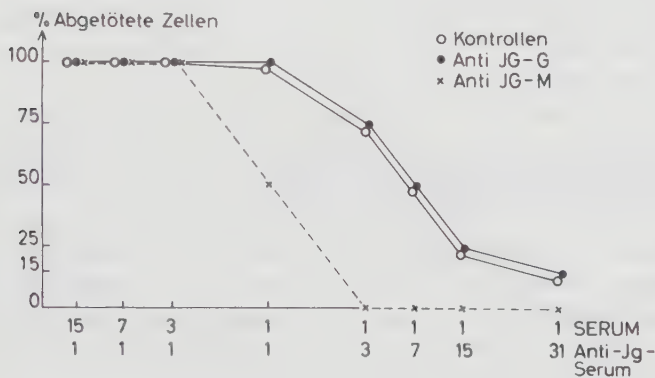


Abb.4. Inaktivierung lymphozytotoxischer Seren durch Präzipitation mit spezifischen Anti-Immunglobulin-Seren. Auf der Abszisse sind die Anteile des zu inaktivierenden Serums und der spezifischen Anti-Immunglobulin-Seren aufgetragen.

Die Aktivität war also durch die Präzipitation von IgM aus dem Serum zu entfernen, während sich durch Präzipitation von IgG ein solcher Effekt nicht erzielen ließ. Die Abnahme der Aktivität mit Anti-IgG ist lediglich der einer Verdünnungsreihe mit den Kontrollen vergleichbar.

Dies gibt einen Hinweis, daß die für die zytotoxische Aktivität des Serums verantwortlichen Antikörper zur Klasse der IgM-Immunglobuline gehören.

Die lymphozytotoxischen Antikörper, die bei den untersuchten Autoimmunerkrankungen auftreten, können also durch folgende Charakteristika beschrieben werden:

1. Sie haben ihr Reaktionsoptimum in vitro bei einer Temperatur von 15°C.
2. Sie reagieren mit den autologen und homologen Lymphozyten.
3. Sie gehören zur Klasse der IgM-Immunglobuline.

5.1.0 Diskussion

5.2.0 Verhältnis des beschriebenen Kälteautoantikörpers zu den HL-A-Antikörpern

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei dem beschriebenen Kälteautoantikörper um einen Antikörper der HL-A-Kategorie handeln könnte, sei hier noch einmal kurz die einleitend gegebene Charakterisierung dieser Antikörper wiederholt:

a.) Bei den HL-A-Antikörpern handelt es sich um eine Kategorie von Transplantationsantikörpern, die sich spezifisch gegen homologe Antigene von Lymphozyten richten. In vitro werden diese Zellen durch HL-A-Antikörper entweder agglutiniert, oder ihre Membran wird so verändert, daß sie für Vitalfarbstoffe durchlässig wird (zytotoxische Wirkung). Ihre praktische Bedeutung erhalten sie

durch die Tatsache, daß die Identität von Lymphozyten-antigenen (HL-A-Antigenen) mit den für die Transplantationsreaktion wichtigen Gewebsantigenen erwiesen werden konnte. Die Ausstattung von Lymphozyten mit einem spezifischen Antigenmuster ist genetisch determiniert (26, 27, 28).

b.) Die Entstehung von HL-A-Antikörpern in einem Individuum wird in der Regel durch eine Sensibilisierung mit homologen Gewebsantigenen induziert (28).

c.) HL-A-Antikörper gehören fast durchweg zur Klasse der IgG-Immunglobuline. IgM-Antikörper sind nur selten hier zu beobachten (1).

d.) Das Reaktionsoptimum dieser Antikörper in vitro liegt bei einer Temperatur von 37°C.

e.) Die Tatsache, daß ein (monospezifischer) HL-A-Antikörper sich jeweils nur gegen ein Antigen von vielen möglichen richtet, seine Spezifität also, bringt es mit sich, daß dieser Antikörper nur mit jenem Prozentsatz eines Kollektivs von Lymphozyten reagiert, der dieses Antigen an seiner Oberfläche trägt. Nur sehr wenige, z.B. jene, welche sich gegen das polyspezifische Leukozyten-Antigen 4b (W6) richten, reagieren mit ca. 80% aller Lymphozyten (27).

Vergleicht man diese Charakterisierung mit der Charakteristik des in den Ergebnissen beschriebenen Autoantikörpers, so kommt man in der hier gestellten Frage zu folgendem Urteil:

a) Er hat, anders als die HL-A-Antikörper, sein Reaktionsoptimum in vitro bei einer Temperatur von 15°C.

b) Er ist zytotoxisch für mehr als 50% der getesteten Lymphozytenpopulationen, d.h. er hat eine sehr geringe Spezifität.

c) Er gehört ausschließlich zur Klasse der IgM-Immunglobuline.

Diese drei Eigenschaften unterscheiden den hier beschriebenen Autoantikörper deutlich von den oben für HL-A-Antikörper als charakteristisch bezeichneten. Seine Zugehörigkeit zu dieser Antikörperart ist daher unwahrscheinlich.

Ausgeschlossen werden kann diese Zugehörigkeit aber durch die Tatsache, daß dieser Antikörper durchweg auch für die autologen Lymphozyten zytotoxisch ist. Das aber ist für Transplantationsantikörper, die sich immer nur gegen homologe Antigene richten, unmöglich.

5.3.0 Beziehung des lymphozytotoxischen Autoantikörpers zu serologischen Daten

Das Auftreten lymphozytotoxischer Antikörper, wie sie hier beschrieben sind, wurde mittlerweile vor allem im Zusammenhang mit Erkrankungen an Lupus erythematoses visceralis in mehreren Arbeiten untersucht (Terasaki et al. 33, Stastny u. Ziff 30, Ooi et al. 25, Butler et al. 3, Lies et al. 13, June F. Shaw 29, Mittal et al. 22). Terasaki, der die Seren von 117 Patienten mit Lupus erythematoses und rheumatoider Polyarthritits untersucht hat (33), fand dabei mit Hilfe eines statistischen Verfahrens, der chi-Quadrat-Methode, signifikante Korrelationen zwischen dem Auftreten lymphozytotoxischer Antikörper und dem antinukleären Faktor (ANF). Ebenso fand er eine signifikante Häufung der HL-A-Loci 11 und Te 54 (Terasaki-System) im Zusammenhang mit Erkrankungen an Lupus erythematoses mit Ausbildung lymphozytotoxischer Antikörper.

June F. Shaw (29) kommt, was die Beziehung zu HL-A-Antigenen betrifft - sie untersucht auch im Zusammenhang mit den ABO-Blutgruppen - zu dem Ergebnis, daß hier keine erkennbare Korrelation zu finden sei. Zu diesem Ergebnis kommt auch Richard B. Lies (13).

Butler et al. (3) befassen sich ebenfalls mit der Frage einer erkennbaren Korrelation zwischen dem Auftreten des ANF und lymphozytotoxischer Antikörper, und kommen an Hand einer Verlaufsbeobachtung, bei der sie konstante ANF-Titer bei wechselnden lymphozytotoxischen Aktivitäten fanden, zu dem Resultat, daß eine Verbindung zwischen beiden eher unwahrscheinlich sei.

In unseren Untersuchungen war bei allen 10 Patienten mit Lupus erythematodes visceralis ein ANF durch Immunfluorescens- und Latex-Test nachgewiesen. Bei 3 von ihnen konnte ein lymphozytotoxischer Antikörper gefunden werden.

Umgekehrt waren bei 11 Patienten mit positivem Autoantikörpernachweis nur 3 mit ANF. Sieht man allein diese Zahlen, so ist eine Beziehung zwischen beiden Phänomenen eher unwahrscheinlich. Eine sichere Stellungnahme ist uns aber nicht erlaubt, da die Gesamtzahl der untersuchten Patienten und vor allem die Zahl der nach unseren Kriterien (s.o.) positiven Ergebnisse zu gering ist.

Ebenso können wir an Hand dieser Arbeit nicht zu der Frage Stellung nehmen, ob im Zusammenhang mit Erkrankungen an Lupus erythematodes visceralis mit Auftreten lymphozytotoxischer Antikörper eine überdurchschnittliche Häufung bestimmter HL-A-Loci zu beobachten ist. Eine vollständige Klassifizierung aller untersuchter Personen im HL-A-System scheiterte am Mangel spezifischer Testseren.

Einer Klärung bedarf auch die Frage, inwieweit ein Zusammenhang zwischen dem Immunphänomen Rheumafaktor und den hier beschriebenen Makroglobulinen mit lymphozytotoxischer Eigenschaft besteht. Naito et al. (24) meinen, hier eine Korrelation zwischen dem Auftreten beider Erscheinungen gefunden zu haben.

Hierzu kann für unsere Untersuchung lediglich angeführt

werden, daß wir 15 Patienten mit positivem Rheumafaktor untersucht haben, von denen bei 4 auch eine lymphozytotoxische Aktivität vorhanden war. Umgekehrt war nur bei 3 von 11 lymphozytotoxischen Seren der Rheumafaktornachweis positiv.

Malchow et al. (14) haben zur Beantwortung dieser Frage 70 Serumproben mit einem Waaler-Rose-Titer von mehr als 1:32 untersucht, und eine deutliche cytotoxische Aktivität nur in einem Fall, schwache Aktivitäten in zwei weiteren Fällen gefunden. Daß Ergebnisse durch das Vorliegen eines Prozonophänomens negativ waren, konnte ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse lassen somit den Schluß zu, daß es sich bei dem hier beschriebenen zytotoxischen Autoantikörper und dem Rheumafaktor um zwei verschiedene, voneinander unabhängige Immunphänomene handelt.

5.4.0 Beziehung zu klinischen Daten und Therapie

Unsere Patienten, deren Seren auf zytotoxische Aktivität getestet werden sollte, wurden, wie schon erwähnt, nach ihren Diagnosen ausgewählt. Die Diagnosen waren bereits längere Zeit gesichert und in jedem Fall eine Therapie eingeleitet. Alle Patienten, deren Seren eine zytotoxische Aktivität aufwies, standen unter Steroidtherapie, zwei von ihnen wurden zusätzlich mit Azathioprin behandelt.

Zur Beantwortung der Frage, ob eine derartige Therapie Einfluß auf Auftreten und Stärke der beobachteten Zytotoxizität hat, wäre eine Verlaufsbeobachtung notwendig gewesen, welche Zeiträume vor und nach Einleitung der Therapie umfaßt hätte. Das aber war nach den Kriterien, nach denen unsere Untersuchung durchgeführt wurde (s.o.), nicht möglich.

Butler (3) trifft als ein Ergebnis seiner Untersuchung die lapidare Feststellung: "There was no correlation between the presence of lymphocytotoxic antibody and the concurrent administration of corticosteroids" (a.a.O., S. 235). Im weiteren Verlauf seiner Arbeit stellt er aber fest, daß eine signifikante Beziehung zwischen der lymphozytotoxischen Aktivität und der Ausprägung des Krankheitsbilds bei Lupus erythematodes visceralis in Form von Fieber, Hautzeichen, Manifestationen am ZNS und haematologischen Manifestationen in Form von Leukopenie, haemolytischer Anämie und Abfall der C'3-Konzentration im Serum besteht. Eine Beziehung zur Ausprägung einer diffusen Glomerulonephritis, die Butler verneint, fanden B.S. Ooi et al. (25).

Stastny und Ziff (30) berichten an Hand einer Verlaufsbeobachtung über einen Patienten mit Lupus erythematodes visceralis, bei dem nach Einleitung einer Steroidtherapie die ursprünglich im Serum vorhandene zytotoxische Aktivität erlosch (a.a.O., S. 546). Ähnliche Beobachtungen habe man auch bei sieben anderen Patienten gemacht.

Malchow et al. (14) berichten den Fall eines Patienten, bei dem sechs Wochen nach Absetzen einer Prednison-Therapie der ursprünglich negative Befund stark positiv wurde mit konstantem Titer während der gesamten Beobachtungszeit.

Diese letzten Beobachtungen weisen darauf hin, daß ein Zusammenhang zwischen Therapie und der Ausprägung lymphozytotoxischer Aktivität im Serum durchaus nicht so ohne weiteres verneint werden kann, wie Butler meint.

Die vorliegenden Beobachtungen reichen allerdings zu einer endgültigen Beantwortung dieser Frage nicht aus.

5.5.0 Ergebnisse anderer Untersuchungen zu diesem Thema und Methodenkritik

Die Untersuchungen, die bisher zu diesem Thema veröffentlicht wurden, berichten von teilweise recht unterschiedlichen Ergebnissen. So berichten Stastny und Ziff (30) von einem zytotoxischen Antikörper bei Lupus erythematoses visceralis, der sein Reaktionsoptimum bei einer Inkubationstemperatur von 37°C hat, bei 22°C schwächer reagiert und keine Aktivität in der Kälte zeigt. Sie untersuchten hier allerdings nur bei 5°C , was die Differenz zu unserem Ergebnis, das in diesem Punkt dem von P. Terasaki (33) entspricht, erklären dürfte. Daß Terasaki allerdings im Gegensatz zu unseren Feststellungen den Antikörper fast ausschließlich bei 15°C aktiv sieht, bei 22°C nur eine schwache und bei 37°C keine Aktivität registriert, könnte mit den unterschiedlichen Testbedingungen zusammenhängen.

Mittal (22), der ebenfalls die Reaktionstemperatur mit 37°C angibt, hat nur bei dieser Temperatur untersucht. Seine Angaben über die Globulinnatur des Antikörpers - er bestimmte die Aktivität in der IgG-Fraktion - unterscheiden sich ebenfalls von unseren Ergebnissen, während wir auch hier wieder mit Terasaki übereinstimmen.

Terasaki wie auch Stastny und Ziff betrachten bei ihren Untersuchungen Serum schon dann als zytotoxisch, wenn es mit 10% der getesteten Lymphozytenpopulationen eine positive Reaktion gezeigt hat. Über die jeweilige Stärke dieser Reaktionen erfolgen keine Angaben (30,33).

Da wir bei unseren Untersuchungen in Stichproben vereinzelt auftretende Reaktionen als falsch-positiv erweisen konnten, müssen wir die Angaben der Autoren in diesem Punkt mit großer Vorsicht zur Kenntnis nehmen. Diese Vorsicht scheint uns sowohl gegenüber den Angaben über den Prozentsatz positiver Befunde, als auch gegenüber

den statistisch gewonnenen Ergebnissen, die auf diesen Zahlen ja basieren, als geboten. Wir sind allerdings auch bereit, einzuräumen, daß wir in dem Bestreben, nur einwandfrei reproduzierbare Ergebnisse zu berücksichtigen, die Grenzen der Bewertung etwas zu eng gesetzt haben könnten.

5.6.0 Hypothesen

Über die Rolle, die der hier beschriebene Autoantikörper im Krankheitsgeschehen spielen könnte, wie auch über mögliche Ursachen seines Auftretens lassen sich einige Hypothesen formulieren, die auch eine grobe Zielrichtung für weitere Untersuchungen zu diesem Thema skizzieren.

Schon in der Einleitung ist erwähnt, daß die Beobachtung, daß die vor allem im Zusammenhang mit der Erkrankung an Lupus erythematodes visceralis auftretende Leukopenie, die hauptsächlich eine Lymphopenie ist (19), den Anlaß gaben für die Untersuchungen, die schließlich zur Beschreibung dieses lymphozytotoxischen Autoantikörpers führten.

Stastny und Ziff (31) konnten darüber hinaus nachweisen, daß die Lymphozyten von Patienten mit Lupus erythematodes visceralis in aktiven Stadien der Erkrankung in vivo mit Antikörpern beladen sind, und daß in vitro allein durch den Zusatz von Komplement eine Lyse erfolgt. Dieses Phänomen ist gleichzeitig mit einer deutlichen bis starken Lymphopenie der Erkrankten zu beobachten. Unter Therapie geht die Adsorption der Immunglobuline an die Lymphozyten zurück, die Lymphopenie bessert sich.

Auch Butler et al. (3) können in ihrer Arbeit eine Beziehung zwischen Antikörperaktivität und Lymphopenie, wie auch zu einem Abfall des C'3-Titers herstellen.

Daß die Ausbildung lymphozytotoxischer Autoantikörper nicht auf die Erkrankung mit Lupus erythematoses und verwandte Krankheitsbilder beschränkt sein muß, zeigen die Ergebnisse von Malchow et al. (16), die in einer prospektiven Studie nachweisen konnten, daß die beschriebenen Autoantikörper zwar bei Lupus erythematoses und verwandten Krankheitsbildern gehäuft auftreten, ihr Vorkommen aber ubiquitär zu beobachten ist. Da ein gehäuftes Auftreten ebenso in höheren Altersstufen zu finden ist (15), ließe sich vermuten, daß ihr Nachweis generell immunologische Defekt- oder Mangelzustände signalisiert.

Hierzu würde auch die von P. Terasaki (33) formulierte Hypothese passen, daß das Auftreten dieser Antikörper nicht unbedingt pathologisch sein muß. Faßte man ihn als Substrat eines feed-back-Mechanismus auf, durch den eine ungezügelte Proliferation immunkompetenter Zellen verhindert werden soll, so handelte es sich um einen physiologischen Faktor. Daß er bei gesunden Individuen experimentell nicht nachweisbar ist, wäre dann damit zu erklären, daß er nur bei starken Reizen, wie sie z.B. bei immunpathologischen Zuständen vorhanden sind, einen hinreichend hohen Titer erreicht.

Eine potentiell durch virale Einflüsse induzierte Entstehung dieses Antikörpers, wie sie P. Terasaki (33) erwägt, muß doch so lange als sehr spekulativ erscheinen, wie Indizien dafür experimentell noch nicht beizubringen sind.

Schließlich könnte die beobachtete Lymphozytotoxizität lediglich eine Nebenreaktion sein. Wie im Falle der Transplantationsantikörper wäre dann der primäre Reaktionsort in vivo ein Gewebe, und die Reaktion in vitro wäre durch die Identität von Gewebsantigenen und Lymphozytenantigenen zu erklären.

6.1.0 Zusammenfassung

Lymphocytotoxische Antikörper wurden zuerst im Zusammenhang mit den Problemen beschrieben, die sich bei der Heterotransplantation von Haut, Organen und Tumoren ergeben. Die Untersuchungen an dem hier entwickelten System der Human-Leukocyte-Antigens (HL-A) sind noch im Gange.

Die Beobachtung, daß Erkrankungen an Lupus erythematodes visceralis (LE) häufig mit einer Leukopenie, die vor allem eine Lymphopenie ist, einhergehen, führte zusammen mit der Tatsache, daß gerade bei LE eine Vielzahl ungewöhnlicher Antikörper auftreten, zur Formulierung der Hypothese, daß für die beobachtete Leukopenie ein cytotoxischer Antikörper verantwortlich sein könnte. Experimentelle Untersuchungen mit hinreichender Aussagekraft konnten jedoch erst vorgenommen werden, nachdem im Zusammenhang mit den Forschungen am HL-A-System ein spezifisches Nachweisverfahren mit dem Mikrocytotoxizitätstest entwickelt worden war (Mittal, Terasaki, Kissmeyer-Nielsen).

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir das Verfahren nach Kissmeyer-Nielsen, welches wir im Verlauf der Arbeit folgendermaßen modifizierten:

Die gesamte Inkubationszeit wurde auf 3 Stunden und 30 Minuten ausgedehnt. Der Reaktionsansatz mit 0,001 ml Lymphocytensuspension (= 6000 Zellen) und 0,001 ml Patientenserum wurde 30 Minuten ohne Komplement bei Zimmertemperatur vorinkubiert. Die weitere Inkubation erfolgte nach Zugabe von 0,002 ml Kaninchenkomplement. Alle Seren wurden auf ihre Reaktion mit den autologen Lymphocyten untersucht.

Auf diese Weise untersuchten wir die Seren von 52 Patienten, die nach ihrer Krankengeschichte ausgewählt waren, sowie ein Kontrollkollektiv von 18 gesunden Spendern.

Darüber hinaus wurde die Reaktion der Seren mit den Lymphocyten von 50 willkürlich ausgewählten Spendern geprüft. Ein positives Ergebnis wurde nur dann registriert, wenn ein Serum:

1. mit den autologen Lymphocyten reagierte, und
2. mit mindestens 50% der getesteten Lymphocyten unterschiedlicher Individuen reagierte, und dabei eine Reaktionsstärke von mindestens 15% zerstörter Zellen aufwies.

Nach diesen Kriterien konnte bei 3 von 10 Patienten mit LE, 5 von 24 Patienten mit PCP und 1 von 2 Patienten mit progressiver Sklerodermie ein lymphocytotoxischer Autoantikörper nachgewiesen werden. Bei den 16 Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis sowie denen der 18 gesunden Spender wurde kein Antikörper gefunden. Eine Untersuchung von Serumfraktionen, bei denen entweder die IgG- oder die IgM-Immunglobuline durch Präzipitation mit einem spezifischen Antiserum vom Kaninchen ausgefällt worden waren, ergab, daß der Antikörper zur Klasse der IgM-Immunglobuline gehört.

Der hier beschriebene Antikörper ist kein HL-A-Antikörper, was durch folgende Unterscheidungskriterien deutlich wird. Im Gegensatz zu den HL-A-Antikörpern hat der hier untersuchte: 1. sein Reaktionsoptimum in vitro bei 15°C. 2. Gehört er zur Klasse der IgM-Immunglobuline, während HL-A-Antikörper überwiegend IgG sind. 3. Schließlich, und das ist das wichtigste Kriterium, reagiert dieser Antikörper mit den autologen Lymphocyten. Das ist für HL-A-Antikörper nicht möglich, da diese nur durch heterologe Gewebsantigene induziert werden.

Da innerhalb des Untersuchungszeitraumes unbehandelte Patienten nicht greifbar waren, somit alle Erkrankten mit positivem Autoantikörpernachweis unter immunsuppressiver Therapie standen, konnte in der vorgelegten Arbeit

über die Stellung im jeweiligen Krankheitsgeschehen die dem Auftreten eines solchen Antikörpers zukommt, wie seine Beziehung zu den übrigen serologischen Daten ist und ob sein Auftreten durch die Verabreichung von Corticosteroiden und Immunsuppressiva beeinflußt wird, keine Aussage gemacht werden.

7.1.0 Literaturliste

- 1 Ahrons, S., Glavind-Kristensen, S.
Cytotoxic HL-A Antibodies: Immunglobulin Classification
Tissue Antigens 1, 121 (1971)
- 2 Amos, D.B.
The agglutination of leukocytes by isoimmune sera.
Brit. J. Exp. Path. 34, 464 (1953)
- 3 Butler, W.T., Sharp, J.T., Rossen, R.D., Lidsky, M.D.,
Mittal, K.K., Gard, D.A.
Relationship of the clinical course of systemic lupus
erythematosus to the presence of circulating lympho-
cytotoxic antibodies.
Arth. Rheum. 15, 231 (1972)
- 4 Dausset, J.
Leuko-agglutinins.
IV. Leuko-agglutinins and blood transfusions.
Vox sang. 4, 190 (1954)
- 5 Dausset, J.
Iso-leuco-anticorps.
Acta haemat. (Basel) 20, 156 (1958)
- 6 Dausset, J., Brecy, H.
Test direct de consommation de l'antiglobuline sur
les leucocytes et les plaquettes de certains malades
atteints de pancytopenies idiopathiques.
Vox sang. (Basel) 3, 197 (1958)
- 7 Dausset, J., Colombani, J., Colombani, M.
Study of leukopenias and thrombocytopenias by direct
antiglobulin consumption test on leukocytes and/or
platelets.
Blood 18, 672 (1961)

- 8 Engelfriet, C.P., Loghem, J.J.V.
Studies on leukocyte iso- and auto-antibodies.
Brit. J. Haemat. 7, 223 (1961)
- 9 Gorer, P.A.
Antigenic basis of tumor transplantation.
J. Path. and Bact. 47, 231 (1938)
- 10 Grifoni, V., Del Giacco, G.S., Marconi, P.E.
Lymphocytotoxins in Hodgkin's disease.
Ital. J. Immunol. 1, 21 (1970)
- 11 Kissmeyer-Nielsen, F., Kyerbye, D.E.
Lymphocytotoxic micro-technique. Purification of
lymphocytes by flotation.
In: Histocompatibility Testing. Ed.: Munksgaard,
Copenhagen, 1967, S.381
- 12 Klingelhöfer, H.L., Malchow, H., Havemann, K.,
Börngen, U1
Lymphocytotoxische Antikörper bei Autoimmunerkrankungen.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 78, 884 (1972)
- 13 Lies, R.B., Messner, R.P., Williams, R.C.
Relative T-cell specificity of lymphocytotoxins from
patients with systemic lupus erythematosus.
Art. Rheum. 16, 369 (1973)
- 14 Malchow, H., Horstkamp, B., Johannsen, R.,
Schmidt, W., Havemann, K.
Serologische, chemische und biologische Eigenschaften
lymphocytotoxischer Autoantikörper.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 80, im Druck (1974)
- 15 Malchow, H., Klingelhöfer, H.L., Johannsen, R.
Analyse der Patienten mit positiven zytotoxischen
Reaktionen auf homologe Lymphozyten.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 80, im Druck (1974)

- 16 Malchow, H., Klingelhöfer, H.L., Rau, B., Tücke, M.,
Himmelmann, G.
Häufigkeit und Vorkommen lymphocytotoxischer Anti-
körper und Autoantikörper in einem unausgewählten
und einem ausgewählten Krankengut.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 79, 590 (1973)
- 17 Medawar, P.B.
Immunity to homologous grafted skin.
II. The relationship between the antigens of blood
and skin.
Brit. J. Exp. Path. 27, 15 (1946)
- 18 Michael, S.R., Vural, L.L., Bassen, F.A.
The hematologic aspects of disseminated (systemic)
lupus erythematosus.
Blood 6, 1059 (1951)
- 19 Miescher, P.
Leukopénie chronique par auto-anticorps.
Acta haematol. 11, 152 (1954)
- 20 Miescher, P.A., Rothfield, N., Miescher, A.
Immunologie phenomena in patients with systemic
lupus erythematosus (Ed. By E.L.Dubois).
McGraw-Hill, New York, 1966, S.93
- 21 Mittal, K.K., Mickey, M.R., Singal, D.P.,
Terasaki, P.I.
Serotyping for homotransplantation.
XVIII. Refinement of microdroplet lymphocyte
cytotoxicity testing.
Transplantation 6, 913 (1968)
- 22 Mittal, K.K., Rossen, R.D., Sharp, J.T., Lidsky, M.D.,
Butler, W.T.
Lymphocyte cytotoxic antibodies in systemic lupus
erythematosus.
Nature (London) 225, 1255 (1970)

- 23 Mottironi, V.D., Terasaki, P.I.
Lymphocytotoxins in disease.
I. Infectious mononucleosis, rubella, and measles.
Ed.: Histocompatibility Testing, Munksgaard, Copenhagen, (1970), S.301
- 24 Naito, S., Mickey, M.R., Hirata, A., Terasaki, P.I.
Autolymphocytotoxins following immunization by pregnancy, transplantation, and disease.
Tissue Antigens 1, 219 (1971)
- 25 Ooi, B.S., Orlina, A.R., Pesce, A.J., Mendoza, N., Masaitis, L., Pollak, V.E.
Lymphocytotoxic antibodies in patients with systemic lupus erythematosus.
Clin. Exp. Immunol. 17, 237 (1974)
- 26 Payne, R., Rolfs, M.R.
Fetomaternal leukocyte incompatibility.
J. Clin. Invest. 37, 1756 (1958)
- 27 Van Rood, J.J., Eernisse, J.G.
The detection of transplantation antigens in leukocytes.
Seminars in Hematology 5, 1 (1968)
- 28 Van Rood, J.J., Eernisse, J.D., Van Leeuwen. A.
Leukocyte antibodies in sera from pregnant women.
Nature 181, 1735 (1958)
- 29 Shaw, J.F.
Lymphocytotoxins in lupus erythematosus.
Ala. J. Med. Sci. 8, 210 (1971)
- 30 Stastny, P., Ziff, M.
Antibodies against cell membrane constituents in systemic lupus erythematosus and related diseases.
I. Cytotoxic effect of serum from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) for allogeneic and for autologous lymphocytes.
Clin. Exp. Immuno. 8, 543 (1971)

- 31 Stastny, P., Ziff, M.
Direct lysis of lymphocytes by complement in patients with systemic lupus erythematosus.
Arth. Rheum. 14, 733 (1971)
- 32 Terasaki, P.I., McClelland, J.D.
Microdroplet assay of human serum cytotoxins.
Nature (London) 204, 998 (1964)
- 33 Terasaki, P.I., Mottironi, V.D., Barnett, E.V.
Cytotoxins in disease.
II. Autocytotoxins in lupus.
N. Engl. J. Med. 283, 724 (1970)
- 34 Tullis, J.L.
Leukocyte and thrombocyte antibodies. Current concepts of their origin, identity, and significance.
J. Amer. Med. Ass. 180, 958 (1962)
- 35 Walford, R.L.
Leukocyte antigens and antibodies.
Grune and Stratton, New York, 1960

Lebenslauf

Heinz Ludwig Klingelhöfer

355 Marburg

Im Stiftfeld 8

Am 31.12.1940 wurde ich als erstes Kind der Eheleute Johannes Klingelhöfer und Frau Anna, geb. Böttner in Kleinseelheim, Krs. Marburg, geboren.

Herbst 1946 Einschulung an der Volksschule Marburg-Ockershausen.

Juli 1948 Erkrankung an spinaler Kinderlähmung.

Ostern 1952 Aufnahme in die Friedrich-Ebert-Mittelschule Marburg.

Ostern 1959 Mittelschulabschluß mit dem Zeugnis der Mittleren Reife. Übergang in die Untersekunda des Neusprachlichen Zweigs am Aufbaugymnasium der Gesamtschule in Kirchhain, Krs. Marburg.

Februar 1963 Abitur.

Sommersemester 1963 bis Sommersemester 1967 Studium der Theologie in Marburg, Heidelberg und Göttingen.

Wintersemester 1967/68 bis Wintersemester 1972/73 Studium der Medizin in Marburg.

Oktober 1968 naturwissenschaftliche Vorprüfung. Note: befriedigend

März 1970 ärztliche Vorprüfung. Note: gut

August 1973 Staatsexamen. Note: sehr gut

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Ammon, Arnót, Aust, Barthelmai, Berendes, Bommer, Braasch, Buchholz, Castenholz, Dimroth, Daume, Dittrich, Dölle, Engelhardt, Eschenbach, Exner, Friederich, Ganz, Gerdes, Golenhofen, Gottesbüren, Haberich, Hamelmann, Hardewig, Havemann, Heinecker, Hort, Hensel, Hering, Hess, Heuser, Jacob, Kaffarnik, Karlson, Keil, Klaus, Koecke, Knauf, Koch, Koransky, Kühnel, Kunz, Lange, Lauth, Linneweh, Maar, Malchow, Mannheim, Martini, Massarat, Nöth, Nultsch, Petry, Pots, Riecken, Remschmidt, Rodeck, Rohen, Schleiyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Siegert, Solcher, Strohmeyer, Thoenes, Uhlarik, Wendt, Wesemann, Wepler, Wiegand, Willenbockel, Walcher, Wulf.

